

細胞内 GTP 感知機構の進化を明らかにする  
PI5P4K-ヌクレオチド複合体の立体構造解析  
Structural analysis of PI5P4K-nucleotide complexes  
to unveil the evolution of the intra cellular GTP sensor

竹内恒<sup>1,\*</sup>, 千田美紀<sup>2</sup>, 千田俊哉<sup>2</sup>

<sup>1</sup>産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門

〒135-0063 東京都江東区青海 2-3-26

<sup>2</sup>高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所放射光

〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Koh Takeuchi<sup>1,\*</sup>, Miki Senda<sup>2</sup>, Toshiya Senda<sup>2</sup>

<sup>1</sup>AIST, 2-3-26 Aomi, Koto, Tokyo 135-0063, Japan

<sup>2</sup>KEK, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

## 1. はじめに

細胞の生存にとって、エネルギー代謝は最も重要な機能の一つである。その中で、GTP はタンパク質合成やシグナル伝達に利用される細胞内エネルギー物質であり、細胞内では ATP に次ぎ 2 番目に多く存在する。我々の研究などから、少なくとも哺乳細胞において、GTP の細胞内濃度は ATP とは独立に制御されていることがわかりつつある。

我々は、イノシトールリン脂質キナーゼの一種 PI5P4K $\beta$  が、哺乳細胞において細胞内 GTP センサーとして機能することを世界に先駆けて示した[1]。また、PI5P4K $\beta$  が細胞内 GTP 濃度に応じて細胞増殖を制御すること、また、少なくとも一部のがん細胞が、この細胞内 GTP センサーを悪用して増殖することを発見した。この成果は、生化学・創薬科学（竹内 恒・産総研）、構造生物学（千田 俊哉・KEK）、細胞生物学（佐々木 敦朗・シンシナティ大）と異なる専門性を持つ研究グループが一体となった共同研究体制があって、はじめて成し遂げられたものであり、その際、PI5P4K $\beta$ -GTP 複合体結晶構造に基づく、逆遺伝学的アプローチが決定的な役割を果たした[2]。また、その過程で、我々は、多重ソーキング法など新たな技術開発を行いながら [3]、PI5P4K $\beta$  複合体の結晶構造解析を効率化することにも成功している。

興味深いことに、PI5P4K の  $\beta$  アイソタイプは脊椎動物にしか存在せず、また PI5P4K (別名 Type II PIP kinase) 自体もその祖先種である PI4P5K (別名 Type I PIP kinase) から、多細胞生物へと進化する直前に派生したと考えられる。さらに、PI4P5K は ATP のみを使用する ATP キナーゼであることから、PI5P4K $\beta$  は進化的に GTP 結合能を獲得したと考えられる。また、我々の生化学的解析から、PI5P4K $\beta$  のヌクレオチド特異性を規定するのは 5 残基からなる短いモチーフであること、さらに PI5P4K $\beta$  は GTP のみならず、ITP (イノシトール 3 リン酸)、

XTP (キサンチン 3 リン酸) などとともに結合し、これらを酵素反応に利用する幅広いヌクレオチド特異性を有することが明らかとなった。さらに、変異実験などにより、進化の過程で ITP、XTP に特異的な PI5P4K が存在した可能性も明らかになってきている。

そこで本研究は、PI5P4K $\beta$  -ヌクレオチド複合体の結晶構造解析を行い、PI5P4K $\beta$  が様々なヌクレオチドとの広範な特異性を持つ理由とその意義を明らかにすることで、本研究をさらに発展させ、細胞が GTP センサーを進化的に獲得した過程を明らかにすべく研究を推進した。

## 2. 実験

結晶化に供する human PI5P4K $\beta$  は大腸菌において発現し、N 末端 His\*6 タグを用いた精製の後、His\*6 タグを酵素的に切断し、さらに Resource Q カラムによる精製を行った。その結果、高純度の human PI5P4K $\beta$  標品を調製することができた。結晶化は、PI5P4K $\beta$  の apo 体について行い、ヌクレオチドをソーキングすることで、複合体結晶を得た。立体構造決定は、申請者が PDB に登録した PI5P4K $\beta$  の結晶構造を用いた分子置換法により行い、Phenix および Coot を使用して構造精密化とモデル構築を行った。

## 3. 結果および考察

apo 結晶に対する補酵素のソーキング・結晶凍結条件の最適化を行った結果、ATP、GTP のみならず、ITP、XTP などについても、2.7-2.9 Å 分解能の結晶構造を得ることに成功した (図 1 A)。また、それらの結合モードを確認したところ、ITP は GTP と同様の結合モードを示したのに対して (図 1 B)、XTP は GTP と同様の結合モードとともに、塩基部分が反転したような結合モードも取ることが明らかとなった (図 1 C)。その際、ITP、XTP とともに 2 位

の酸素原子が結合に重要な役割を果たしていた。2位に酸素原子を有する化学構造は GTP、ITP、XTP に共通している。よって、この結果は、なぜ PI5P4K $\beta$  が ATP、GTP のみならず、ITP、XTP にも結合し、酵素反応に利用出来るのかについて明確な答えを与えた。また、その変化がわずか2残基の変異により達成されたことを構造的に説明した。さらに、結合モードの詳細な解析により、進化の過程で、ITP、XTP により特異的な PI5P4K が生じた構造的な理由を解明することにも成功した [4]。

- [1] Sumita, Lo, and Takeuchi et al, Mol Cell, 61, 187-98 (2016)
- [2] Takeuchi et al, FEBS J., 283, 3556-3562 (2016).
- [3] Senda et al, Crystal Growth & Design, 163, 1565-1571 (2016)
- [4] Takeuchi et al, BioRxiv (2020)  
Doi: 10.1101/2020.06.09.137430

\*koh-takeuchi@aist.go.jp

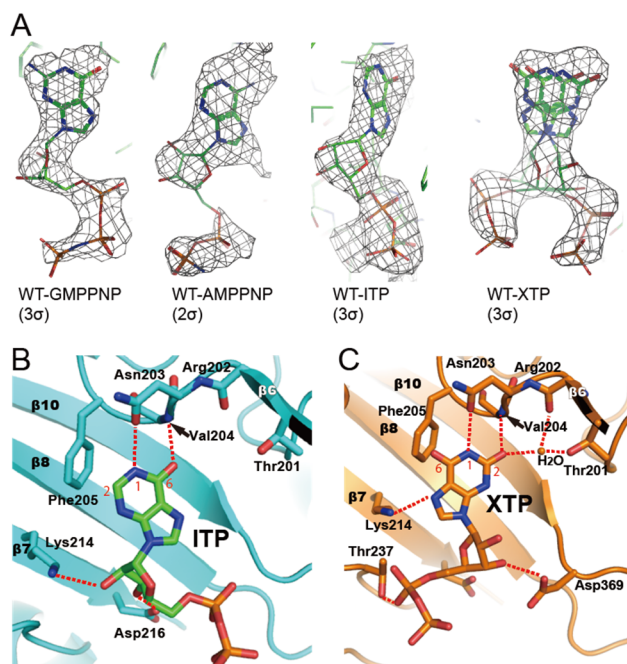


図1 : PI5P4K $\beta$  と各種ヌクレオチドの複合体の構造構造解析

#### 4.まとめ

本研究により、PI5P4K $\beta$  が進化的にどのようにして GTP 結合能を獲得するに至ったのかが明らかとなった。その際、PI5P4K $\beta$  は GTP への完全な特異性を獲得するのではなく、ITP、XTP への結合を許容しながら、GTP に対する親和性を担保する戦略を取った。ITP、XTP は細胞内にはわずかにしか存在しないため、この曖昧な特異性で、GTP センサーとしての機能を十分に発揮することができる。わずかなアミノ酸配列の違いにより、大きな機能変化を生み出した点で興味深く、今後は他の生物種の PI5P4K との比較を行いながら、その進化の過程の詳細に明らかにしていきたいと考えている。

#### 謝辞

実験をサポートして下さったビームラインスタッフと PF の皆様に感謝致します。

#### 参考文献